

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-237298

(P2000-237298A)

(43) 公開日 平成12年9月5日 (2000.9.5)

(51) Int.Cl.	識別記号	F I	テマコード (参考)
A 6 1 L 27/00		A 6 1 L 27/00	F
			J
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願2000-33562 (P2000-33562)	(71) 出願人	599098150 イソティス ビー. ブイ. オランダ国, 3723 エムビー ビルトーヴ エン, プロフ. ブロンクホルストラーン 10
(22) 出願日	平成12年2月10日 (2000.2.10)	(72) 発明者	マホムッド, タヒル アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02142, キャンブリッジ, メモリアルドラ イブ 100 アプト. 8-10エー
(31) 優先権主張番号	9 9 2 0 0 3 9 6. 2	(74) 代理人	100085545 弁理士 松井 光夫
(32) 優先日	平成11年2月10日 (1999.2.10)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (E P)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 軟骨組織エンジニアリング

(57) 【要約】

【課題】 組織エンジニアリング軟骨のための改善された足場を提供する。

【解決手段】 本発明は、組織エンジニアリング軟骨のための足場として生分解性、生物適合性、多孔性マトリックスを使用する方法に関し、該マトリックスが、ポリアルケレングリコールと芳香族ポリエステルとのコポリマーから形成されているところの方法である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 組織エンジニアリング軟骨のための足場として生分解性、生物適合性、多孔性マトリックスを使用する方法において、該マトリックスが、ポリアルキレングリコールと芳香族ポリエステルとのコポリマーから形成されているところの方法。

【請求項 2】 足場が、軟骨細胞、骨前駆体細胞、幹細胞、又は骨膜若しくは軟骨膜組織の細胞を備えられているところの請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 ポリマー状物質が、ポリエチレングリコールとポリ（ブチレンテレフタレート）とのコポリマーであるところの請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】 マトリックスが、カルシウムホスフェートコーティングを含むところの請求項 1～3 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 5】 マトリックスが、ポリマー状物質の外表面を有する第一の部分、及びセラミックス物質の外表面を有する第二の部分を含む複合体であるところの請求項 1～4 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 6】 セラミックス物質が、カルシウムホスフェートコーティングであり、又はオクタカルシウムホスフェート、ヒドロキシアパタイト、カルボネートアパタイト及び他のアパタイト、 α -トリカルシウムホスフェート、 β -トリカルシウムホスフェート、ナトリウムカルシウムホスフェート及び他のウイトロック石、並びにそれらの組合せの群から選ばれるところの請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】 請求項 1～6 のいずれか一つに記載の組織エンジニアリング軟骨のための足場として使用されるための、ポリアルキレングリコールと芳香族ポリエステルとのコポリマーから形成されるところの生分解性、生物適合性、多孔性マトリックス。

【請求項 8】 軟骨細胞、骨前駆体細胞、幹細胞、又は骨膜若しくは軟骨膜組織の細胞を備えられているところの請求項 7 記載のマトリックス。

【請求項 9】 請求項 7 又は 8 記載の足場の移植を含むところの軟骨を修理するための方法。

【請求項 10】 軟骨を修理するための、患者における移植のための足場を製造するために、ポリアルキレングリコールと芳香族ポリエステルとのコポリマーから形成された生分解性、生物適合性、多孔性マトリックスを使用する方法。

【請求項 11】 請求項 7 記載のマトリックスを含み、かつ軟骨組織を有する軟骨インプラント。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、組織エンジニアリング軟骨の方法で使用するための足場に関する。

【0002】

【従来の技術】 関節軟骨の自己修復不能は、外傷性のけ

がによって関節が傷ついている患者、あるいは関節炎または骨関節症などの変形性症状を患っている患者の治療では、大きな問題である。現在用いられている治療の例としては、軟骨下の穿孔（subcondral drilling）および剥離（abrasion）が挙げられる。しかし、これらの治療は、新規もしくは置き換え軟骨組織または軟骨様組織の形成を促進しないので、長期においてはほとんど有効でない。その代わりに、これらの治療は、瘢痕または繊維組織をもたらし、それらは、長期にわたる関節荷重に耐えることができない。すなわち、これらの従来の技法を使用して治療された患者の症状は、最初は良くなるが、結局は悪化し、恐らく骨関節症を招く。

【0003】 軟骨の損失を治療するために従来依存している別の治療は、整形修復のためのシリコンまたは関節裏装（joint relinament）のための金属合金などの補てつ物質による置き換えである。プロテーゼを入れることは、元の軟骨によって与えられる完全な機能の回復の無い、その下にある組織および骨の重大な損失、ならびに異物の刺激的な存在と通常関連する。永久的な異物と関連した他の長期的問題としては、感染、腐食および不安定性を挙げることができる。

【0004】 最近、軟骨組織修復への新しい方法が提案されている。これらの方法は、膨張した自己の細胞自体を患者の軟骨組織の欠陥に移植または注入することに基づく。しかし、とかくするうちに、こうして移植された細胞の大部分は持ちこたえないだろうということが認められた。また、この方法は、比較的狭い群の患者に適するに過ぎない。

【0005】 さらに最近、EP-A-0469070 で、軟骨構造物のためのインプラントとして、軟骨細胞、繊維芽細胞または骨前駆体細胞を接種した生物適合性合成ポリマーマトリックスを使用することが提案されている。ポリマーマトリックスは、マトリックスに結合した細胞への栄養素および排泄物の自由な交換を提供するために、繊維または繊維メッシュで形成されることが必須であることが開示されている。この自由な交換は、移植後の、インプラントの血管新生がまだ生じていない段階で特に関係することが記載されている。ポリマーマトリックスを提供するために使用される物質は、生体適合性合成物質である。特定して挙げられている唯一の物質は、ポリグラクチン 910（グリコリドとラクチドとの 90:10 コポリマー）である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、組織エンジニアリング軟骨のための改善された足場を提供することを目的とする。目的は、細胞増殖および軟骨の移植のための一時的な足場として供するのに非常に適する人工マトリックスを提供することである。マトリックスは、生物分解性であり、非毒性であり、インビオおよびインビトロの両方での細胞増殖を可能にすべきである。さらに

別の目的は、足場が、関節の変形した軟骨に取って代わるための細胞増殖に使用されるのに十分であり、また望ましくは関節荷重に耐えるのに十分である機械的強度を提供することができるということである。さらに、プラスチックおよび再建的手術においてガラス質または弾力性のある軟骨に取って代わるのに適するように足場を設計することが可能であるべきである。

【0007】

【課題を解決するための手段】驚いたことに、上記の目的は、軟骨組織のエンジニアリングのための足場として特定のポリマー物質の多孔性マトリックスを使用することにより満たされることが分かった。すなわち、本発明は、組織エンジニアリング軟骨のための足場としての、生物分解性で生体適合性の多孔性マトリックスの使用に関する。ここで、該マトリックスは、ポリアルキレングリコールと芳香族ポリエステルとのコポリマーで形成される。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明に従って足場として使用される物質は、軟骨の修復または置き換えでの使用のための上記要件を全て満足する。特に、該物質は、足場が、繊維構造物の使用では達成できないような程度まで関節荷重に耐えることができるように、優れた機械的強度を提供する。

【0009】さらに、本発明の足場が基づくところの特定のポリマー物質はヒドロゲル特性を有し、その多孔性構造物の中での拡散の他に、物質自体の中での拡散を可能にする。もちろん、この特徴は、細胞から、および細胞への栄養素および排泄物の非常に有効な輸送を可能にするので、細胞が足場上に接種され、その上で培養されるときに非常に有利である。第二に、その物質は、80%の水を含んでいてやはりヒドロゲルである天然の軟骨の構造および性質と密接に似ている。さらに、特定のポリマー物質の膨潤挙動は、インビトロで細胞が接種されることなくその物質が移植されるとき、欠陥での構造物の最適な固定を可能にする。

【0010】本発明に従って足場として使用されるべきマトリックスは、生物分解性であり、かつ生体適合性である。本発明の文脈において、生体適合性という言葉は、ヒトまたは動物の許容されない応答を実質的に伴うことなく、ヒトまたは動物の体内に取り込まれ得る物質を意味するものとする。生物分解性という言葉は、一定期間後に生物環境において分解される物質を意味する。好ましくは、分解速度は、体が、生物分解性の物質が製造されるところのインプラントに取って代わるのに十分な機械的強度を提供する自己組織を生じる速度と同様か同一であるように選択される。

【0011】本発明によれば、マトリックスは、上記で論じたEP-A-0469070により好ましいとされるグリコリドとラクチドとのコポリマーよりも、生物学

的環境における分解速度が遅い。このことは、足場上に接種された細胞によって、またはインビボで存在する周囲の組織の細胞によって合成された細胞外マトリックスが機械的機能を引き継ぐ前のインビボでの全再生期間にわたる機械的サポートを確実にする。

【0012】さらに、本発明のマトリックスは多孔性（すなわち、非繊維質）である。これは、マトリックスが、栄養素および排泄物の拡散を可能にする小さい穴（孔）を付与された実質的に均質な固体構造物であることを意味する。種々の要素（繊維）で構成される繊維構造物とは対照的に、本発明の多孔性マトリックスは、1つの要素で実質的に構成される連続した構造物であり、はっきりした仕切りを含む。本発明のマトリックスにおける孔は、相互連絡しているのが好ましい。

【0013】好ましくは、マトリックスは30~99%、より好ましくは60~95%のマクロ多孔率を有する。マトリックス中の孔は、好ましくは、0.1~2000μm、より好ましくは1~1000μmの直径を有する。マクロ多孔率および孔の直径は、一方では、栄養素および排泄物の十分な拡散が生じることが可能であり、他方では、十分な機械的強度がマトリックスによって付与されるように選択される。

【0014】述べたように、本発明の足場は、ヒドロゲル特性を有する特定の組のポリマー物質で形成される。これは、ポリアルキレングリコールと芳香族ポリエステルとのコポリマーの組である。好ましくは、これらのコポリマーは、40~80重量%、より好ましくは50~70重量%のポリアルキレングリコールおよび60~20重量%、より好ましくは50~30重量%の芳香族ポリエステルを含む。本発明に従う好ましい型のコポリマーは、ブロックコポリマーの群によって形成される。

【0015】好ましくは、ポリアルキレングリコールは、150~4000、より好ましくは200~1500の重量平均分子量を有する。芳香族ポリエステルは、200~5000、より好ましくは250~4000の重量平均分子量を有する。コポリマーの重量平均分子量は好ましくは20,000~200,000、より好ましくは50,000~120,000である。重量平均分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC）によって適切に測定することができる。この技法は、自体公知であり、例えば、溶媒としてのテトラヒドロフランおよび外部基準としてのポリスチレンを使用して行うことができる。

【0016】好ましい実施態様では、ポリアルキレングリコール成分は、式-O-L-O-C-O-Q-C-O-（式中、Oは酸素を表し、Cは炭素を表し、Lは、ポリ（オキシアルキレン）グリコールから末端ヒドロキシル基を除去した後に残る2価の有機残基であり、Qは2価の有機残基である。）の単位を有する。

【0017】好ましいポリアルキレングリコールは、ポ

リエチレングリコール、ポリプロピレングリコールおよびポリブチレングリコールならびにそれらのコポリマー（ポロキサマーなど）の群から選択される。非常に好ましいポリアルキレングリコールは、ポリエチレングリコールである。

【0018】アルキレンおよびポリアルキレンという言葉は一般に、任意の異性体構造を意味する。すなわち、プロピレンは1, 2-プロピレンおよび1, 3-プロピレンの両方を含み、ブチレンは1, 2-ブチレン、1, 3-ブチレン、2, 3-ブチレン、1, 2-イソブチレン、1, 3-イソブチレンおよび1, 4-イソブチレン（テトラメチレン）を含み、より高次のアルキレン同族体に対しても同様である。ポリアルキレングリコール成分は好ましくは、必要ならばポリエステル成分への結合を提供するために、ジカルボン酸残基- $\text{CO}-\text{Q}-\text{CO}-$ を末端に有する。基Qは、Rと同様の定義を有する芳香族基であってもよく、または、エチレン、プロピレン、ブチレンなどの脂肪族基であってもよい。

【0019】ポリエステル成分は好ましくは、単位- $\text{O}-\text{E}-\text{O}-\text{CO}-\text{R}-\text{CO}-$ （式中、Oは酸素を表し、Cは炭素を表し、Eは置換された、または未置換の、2〜8個の炭素原子を有するアルキレンまたはオキシジアルキレン残基であり、Rは置換された、または未置換の2価の芳香族残基である。）を有する。

【0020】好ましい実施態様では、ポリエステルは、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレンテレフタレートおよびポリブチレンテレフタレートの群から選択される。非常に好ましいポリエステルはポリブチレンテレフタレートである。

【0021】800〜1200（好ましくは1000）の重量平均分子量を有するポリエチレングリコールとポリブチレンテレフタレートとの65:35〜75:25（好ましくは70:30）の重量比のコポリマーの使用は、該コポリマーの足場に接種された軟骨細胞などの細胞のより速い増殖をもたらし得ると考えられる。

【0022】コポリマーの調製についてポリエチレングリコール/ポリブチレンテレフタレートコポリマーを例にして説明する。この記載に基づき、当業者は上記分類に入る何らかの所望のコポリマーを作ることができる。ポリアルキレングリコール/ポリエステルコポリマーを調製するための他の方法は、米国特許出願第3,908,201号明細書に開示されている。

【0023】ポリエチレングリコール/ポリブチレンテレフタレートコポリマーは、ジメチルテレフタレート、ブタンジオール（過剰量）、ポリエチレングリコール、酸化防止剤および触媒の混合物から調製され得る。該混合物を反応容器に入れ、約180℃まで加熱し、そしてエステル交換反応が進行するにつれて、メタノールが蒸留される。該エステル交換の間、メチルとのエステル結合がブチレンとのエステル結合により置き換えられる。こ

の工程において、ポリエチレングリコールは実質的に反応しない。エステル交換の後、温度を約245℃までゆっくり上げ、真空にする（最終的には0.1ミリバール未満）。過剰なブタンジオールが蒸留され、ブタンジオールテレフタレートのプレポリマーが、ポリエチレングリコールと縮合して、ポリエチレン/ポリブチレンテレフタレートコポリマーが形成する。テレフタレート部分は、ポリエチレングリコール単位をコポリマーのポリブチレンテレフタレート単位に結合し、従って、該コポリマーはポリエチレングリコールテレフタレート/ポリブチレンテレフタレートコポリマー（PEGT/PBTコポリマー）と呼ばれる場合がある。

【0024】ポリマー物質の多孔性構造は、何らかの公知の方法、例えば塩浸出、または焼結、によって得ることができる。原理的には、例えば転相、凍結乾燥、および塩浸出等の技術の何らかの組み合わせを用いてよい。

【0025】塩浸出方法において、足場物質は溶媒注型法に付されてよく、該方法では、所望する孔サイズを得るために好適な大きさを有する塩粒子を含むところの、適した溶媒中で物質を液体化することによって、基体が形成される。塩/ポリマー溶液は、最終的に、形成されるべき構造の所望される厚みとなるような、所定の高さに固定された基体展開器を用いて板上に展開（be cast）されてよい。塩粒子は、その後、例えば（蒸留）水を用いて洗浄することによってコポリマーから浸出される。

【0026】塩浸出方法においては、ポリマー溶液の代わりに、粘稠なポリマーゲルを使用することも可能である。その場合、該方法における第一工程は、高められた温度、例えば60〜120℃、で、比較的濃縮されたポリマー溶液（好ましくは50重量%以上のポリマーを含む）を調製することである。好ましい溶媒は、比較的高い沸点を有し、且つ、水と混和する。特に良好な結果を与えることが見出された溶媒の例は、N-メチルピロリドンである。該方法の第二工程において、塩粒子をポリマー溶液に添加する。次いで、該溶液を、形成されるべき足場の所望される形状および大きさを有する型に移し、室温まで冷却する。冷却されると、安定なポリマーゲルが形成される。該ゲルを脱塩水に入れると、溶媒と塩とが除去されて、安定な多孔性物質が得られる。

【0027】焼結方法においては、足場物質を型に入れ、次いで、加圧下で、該物質の融点未満の温度まで加熱する。圧力を解放し、該物質を冷却すると、焼結された生成物がもたらされる。当業者は、その一般的知識に基づき、所望する多孔性構造が得られるように、該焼結工程の間の条件を適合し得る。

【0028】本発明の足場を形成する特定のポリマー物質の他の利点は、該物質中に生分解性薬剤を含有することであり、該薬剤は、インビボで該物質が劣化するに従い、ゆっくりと放出される。この点について、米国特

許第5,980,948号明細書が参照され、該明細書の内容は引用により本明細書に含まれる。

【0029】好ましい実施態様において、足場の外表面は部分的に又は完全にセラミックスコーティングが施される。好ましくは、該セラミックスコーティングは、カルシウムフォスフェートコーティングである。該セラミックスコーティングの存在は、該足場への細胞の付着にとって、非常に有益であることが見出された。カルシウムフォスフェートは、該ポリマー材料を、低い温度において、大変濃い石灰化溶液に浸漬することによって、ポリマー材料に施与され得る。石灰化溶液は、好ましくは、少なくともカルシウムおよびフォスフェートイオン、および任意にマグネシウム、炭酸塩、ナトリウム、および塩素イオンを含み、それらは、二酸化炭素ガスを吹込むことによって、水中に溶解される。該二酸化炭素ガスの自然放出または空気との交換の間、炭酸カルシウムフォスフェート結晶が該足場上に核形成するまで該石灰化液のpHが上昇する。コーティングが十分な厚みになるまで、石灰化溶液を通る又は石灰化溶液からのCO₂ガスの吹込み/放出工程を繰り返し替えることができる。一般に、該セラミックス層の厚みは、0.1~20μmである。該セラミックスコーティングは、該足場上への細胞の接種(seeding)の間、および、それに続くインビトロでの該細胞の培養の間に、有益な効果があるように設計されることが好ましい。該足場が患者の体内に移植されるべき時まで、該セラミックスコーティングが実質的に消えてしまうことが、さらに好ましい。このことは、例えば細胞または培養媒質の存在を通じて、例えば消滅、によって達成され得る。

【0030】或る条件下で、特に、骨だけでなく軟骨を含む、全厚軟骨損傷(full-thickness cartilage defects)の治療に使用することを意図されている場合、上述したタイプのポリマー物質の外表面を有する第一の部分と、セラミックス物質の外表面を有する第二の部分とを含む複合体の足場を用いることが有利であることが見出された。該複合体マトリックスは、好ましくは、セラミックス部分が骨の機能を擬し、ポリマー部分が軟骨の機能を擬するところの、2層系である。このようにして、該複合体マトリックスは、軟骨および骨組織の双方の性質を擬する。さらに、該セラミックスの外表面は、インビボおよびインビトロの双方において、細胞が該足場に付着するのを容易にする。

【0031】該複合体マトリックスの第一部分は、好ましくは、実質的にその全体が、上述のタイプのコポリマーから形成される。該複合体マトリックスの第二部分は、実質的に完全にセラミックス物質から形成される。好適なセラミックス物質の例は、カルシウムフォスフェート、カルシウムカーボネート、およびナトリウムカルシウムフォスフェートを含む。特に適したセラミックス物質は、オクタカルシウムフォスフェート、アパタイ

ト、例えばヒドロキシアパタイトおよびカーボネートアパタイト、ウイトロック石、例えばα-トリカルシウムフォスフェート、β-トリカルシウムフォスフェート、ナトリウムカルシウムフォスフェート、およびこれらの組み合わせよりなる群から選ばれる。第二部分は、異なる物質から形成されているが、上述のようなセラミックス物質で覆われていることもできる。該異なる物質は、何らかのタイプのポリマー物質、好ましくは上述したポリアルキレングリコールと芳香族エステルとのコポリマー、または、他の適した物質、例えばバイオガラス、もしくはガラス-セラミックスである。

【0032】好ましい実施態様において、細胞が一の部分から他の部分へと動くのを防ぐために、好ましくは上述のポリアルキレングリコールと芳香族エステルとのコポリマーの濃厚な層が、ポリマー部分とセラミックス部分との間に施与される。

【0033】複合体は、何らかの好適な方法、例えば複合体の足場の、所望の形状を有する型を与えることにより調製されてよい。のセラミックス部分は、別個に調製されて該型内に置かれ、そして、該セラミックス部分の上にポリマー層が、例えば射出成形によって、注型されてよい。ポリマー部分を、ポリマー-塩溶液の形態で施与することができ、それは上述の、所望の多孔性を達成するための塩浸出工程で使用される。任意に、最初に、濃厚な層がセラミックス部分上に施与されてよい。射出成形の間に、ポリマー物質がセラミックス部分の孔に或る程度侵入するので、複合体のセラミックス部分とポリマー部分との間の良好な接着が得られる。

【0034】上述の生分解性、生物適合性の多孔性物質に基づく足場は、勿論本発明に含まれ、インビトロでその上に細胞が接種されて、あるいは、接種されない状態で、組織エンジニアリング軟骨において使用されてよい。該足場は、何らかの公知の方法により、特別の所望される形状を有するように加工されてよい。マトリックスがヒドロゲル特性を有するポリマー物質から形成されている場合には、足場の膨潤挙動は、インプラントがその中へと移植されるところの軟骨組織中の欠陥中における、インプラントの膨潤固定を可能にする。この膨潤固定は、足場が細胞の無い状態で移植されるときに特に有利である。膨潤の程度は、ポリマー物質の組成を調製することにより、適するように制御することができる。

【0035】好ましい実施態様において、移植に先立ち、足場には細胞が接種される。細胞は、天然の軟骨において通常発生する何らかの型の細胞、又は、通常天然の軟骨において発生する細胞へと分化することが可能である何らかの型の細胞であってよい。好ましい細胞の型は、軟骨細胞、骨前駆細胞、幹細胞、および、骨膜組織細胞または軟骨膜組織細胞である。これらの細胞は、それらの粗形態、例えば、1もしくは2以上の型の細胞、または細胞外マトリックスさえも含む、骨髓の形態で使

用してもよい。細胞が自己由来であり、従って、本発明の足場で治療される患者における拒否反応、もしくは、該患者への感染（例えばHIV）の機会を最小に、もしくは、除外さえすることが、さらに好ましい。

【0036】接種は、何らかの公知の方法、例えば静的接種、によって行われて良い。しかし、同時係属の欧州特許出願第98203774.9号（それは、引用により本明細書に含まれる）に記載されているように動的に接種されることが好ましい。該接種工程に続き、細胞が好ましくは、インビトロで培養され、細胞の十分な程度の増殖及び／又は分化が許容される。該培養に要する時間は、要求される接種細胞の数およびインプラントの大きさに依存して、広く変わり得、1時間から数ヶ月の範囲である。

【0037】本発明は、上記足場を、軟骨修理（repair）における医療用インプラントとして使用する方法にも関する。この使用法は、炎症、外傷、老化、または軟骨の先天的な欠陥の結果、患者中の損傷を受けた軟骨に、特に適用される。

【0038】本発明は、以下の非限定的な実施例により、説明される。

【0039】

【実施例】ヒト軟骨細胞が関節の軟骨から分離され、そして多孔性のポリアクティブ足場（55/45(300)、1.55cm直径、300 μ mディスク厚み、マクロ多孔度75%）に接種された。軟骨細胞は、45rpmでの磁気攪拌機を使用してフラスコ中で、24時間足場上に動的に接種され、そして20日間動的に培養された。このように、接種及び培養の両者は、動的な条件下に実施された。培養培地は、4.5g/Lのグルコース、584mg/Lのグルタミン、10%Fetal Bovine Serum（F、50U/mLペニシリン）、50 μ g/mLのストレプトマイシン、10mMのN-2ヒドロキシエチルピペラジンN'-2-エタンスルホン酸（HEPES）、0.1mMの可欠アミノ酸0.4mMのプロリン及び50 μ g/mLのアスコルビン酸を含むDulbeccoの変性されたEagle培地（DMEM）を含む。試料は、接種後3、10及び20日にSEM（走査電子顕微鏡）及びLM（光学顕微鏡）のために採られた。3日後、SEM及びステレオLM（三次元分析を可能にする）の両者は、著しい細胞接着及び内部成長を示した。20日後、マトリックス内での均一な細胞分布及びECM形成が観察された。

フロントページの続き

(72)発明者 リエスレ、イエンズ ウヴェ
オランダ国、1073 エックスエー アムス
テルダム、ゲラルド ドウストラート
192

(72)発明者 ファン ブリッテルスヴィーク、クレメン
ス アントニ
オランダ国、3467 ビーディー ヘケンド
ルプ、ヘケンドルプセ ブウルト 2